

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DA ABELHA NATIVA SEM FERRÃO *NANNOTRIGONA TESTACEICORNIS* (HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINI)

A.L. Gonçalves, A. Alves Filho, H. Menezes

Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Av. 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil. E-mail: airtonlgoncalves@ig.com.br

RESUMO

Diversas propriedades medicinais como antibacteriana, antifúngica, cicatrizante e antioxidante são popularmente relatadas ao mel. Poucos estudos têm sido realizados sobre atividade antimicrobiana (AA) do mel de abelhas sociais da subfamília Meliponinae. O objetivo deste estudo foi investigar a AA do mel de *Nannotrigona testaceicornis*, uma espécie de abelha indígena sem ferrão. Para a avaliação da AA do mel foi empregado o método da difusão em ágar, utilizando-se discos de 6 mm de diâmetro em presença de 10 diferentes microrganismos, obtidos de focos de infecções clínicas. Os testes indicaram resistência em: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* α -hemolítico; e indicaram sensibilidade em: *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, bem como *Staphylococcus* spp. coagulase. Vinte e três antibióticos comerciais distintos foram também avaliados no presente estudo. Os resultados obtidos até o momento apontam para um excelente potencial terapêutico deste produto apícola.

PALAVRAS-CHAVES: Atividade antibacteriana, mel, abelha nativa, *Nannotrigona testaceicornis*.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HONEY FROM NATIVE STINGLESS BEE *NANNOTRIGONA TESTACEICORNIS* (HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINI). Several medicinal properties, such as antibacterial, antifungal, healing and antioxidant activities, are popularly reported for honey. Few studies have been done on the antimicrobial activity (AA) of honey produced by social bees from the sub-family Meliponinae. The objective of this study was to investigate the AA of honey produced by *Nannotrigona testaceicornis*, a native stingless bee. For the honey AA evaluation, the agar diffusion method was assayed against 10 different microorganisms isolated from inoculi obtained from clinically infected sites. Tests indicated resistance in *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, α -hemolytic *Streptococcus*. Susceptibility was observed in *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* as well as in negative-coagulase *Staphylococcus* spp. Twenty-three distinct commercial antibiotics were also assayed in the present study. Results obtained up to this date indicate an excellent therapeutical potential for this natural product.

KEY WORDS: Antibacterial activity, honey, native bee, *Nannotrigona testaceicornis*.

INTRODUÇÃO

O mel de abelhas é um suplemento alimentar que, ultimamente vêm recebendo um incremento no consumo comercial decorrente, principalmente, da comprovação científica de suas diversas propriedades benéficas à saúde (ALLEN *et al.*, 1991).

Além das propriedades nutricionais, a utilização do mel na medicina popular se deve também às suas propriedades farmacológicas. Dentre estas propriedades, a atividade antimicrobiana tem despertado interesse entre os pesquisadores devido ao seu potencial de aplicabilidade em casos clínicos (EFEM, 1988;

ZUMLA & LULAT, 1989; MOLAN, 1992; WILLIX *et al.*, 1992; EFEM *et al.*, 1992; EFEM, 1993; KROL *et al.*, 1993).

Propriedades cicatrizante (KUMAR *et al.*, 1993) e antioxidante (OSZMIANSKI & LEE, 1990) estão também relacionadas a este derivado apícola.

Durante as últimas décadas, a utilização indiscriminada de antibióticos em diversos setores da agricultura, bem como da saúde humana, vêm favorecendo a emergência de linhagens de microrganismos patogênicos apresentando resistência aos mais variados antibióticos. Frente à necessidade de desenvolvimento de novas classes de antibióticos, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com

produtos naturais, sejam de origem vegetal como animal, visando a detecção e caracterização de compostos químicos com propriedades terapêuticas, entre elas a antimicrobiana.

No Brasil, além da *Apis mellifera* introduzida por imigrantes europeus, são também encontradas abelhas sociais nativas, pertencentes à subfamília Meliponinae. Estas são popularmente conhecidas como abelhas-indígenas-sem-ferrão, compreendendo mais de 200 espécies diferentes, algumas das quais frequentemente criadas para a produção do mel (KERR, 1987).

O mel destas abelhas-sem-ferrão é utilizado em terapias populares, principalmente, nas zonas rurais (CORTOPASSI-LAURINO & GELLI, 1991) e entre indígenas, que acreditam que diferentes tipos de mel possuem propriedades curativas específicas, sendo empregado para a cura de um amplo espectro de doenças (POSEY, 1987).

O objetivo do presente estudo foi detectar a atividade antimicrobiana *in vitro*, do mel da abelha-indígena-sem-ferrão *Nannotrigona testaceicornis*, frente a bactérias patogênicas, isoladas de diferentes focos infecciosos humanos. Visando obter-se parâmetros mais precisos desta atividade, foram concomitantemente efetuados ensaios de antibiose com vinte e três diferentes antibióticos comerciais.

MATERIAL E MÉTODOS

Mel

As amostras de mel utilizadas neste trabalho foram obtidas em março de 2005, de colméias mantidas na região de Rio Claro, SP, Brasil. O mel foi envasado em frasco âmbar, estéril e armazenado no escuro à temperatura de 5,4° C.

Discos de papel de filtro Framex 389, faixa preta, estéreis com 6 mm de diâmetro foram acrescidos de 100 µg de mel e posteriormente mantidos em estufa a 35° C por 24h para secagem, acondicionados em recipientes estéreis e armazenados em geladeira a 5,4° C, baseado na técnica de BAUER *et al.* (1966).

Antibióticos

Foram utilizados discos de papel de 6 mm de diâmetro contendo os seguintes antibióticos, nas respectivas concentrações: ampicilina 10 µg (AMP), cefoxitina 30 µg (CFO), cefalotina 30 µg (CFL), cefotaxima 30 µg (CTX), tetraciclina 30 µg (TET), nitrofurantoina 300 µg (NIT), cloranfenicol 30 µg (CLO), sulfazotrim 25 µg (SFT), ciprofloxacina 5 µg (CIP), eritromicina 15 µg (ERI), penicilina G 10 µg (PEN), imipinem 10 µg (IPM), gentamicina 10 µg (GEN), cefepime 30µg (CPM), ceftriaxona 30µg (CRO),

amicacina 30 µg (AMI), aztreonam 30 µg (ATM), ceftazidima 30 µg (CAZ), oxacilina 1 µg (OXA), rifampicina 5 µg (RIF), vancomicina 30 µg (VAN), levofloxacina 5 µg (LVX), clindamicina 2 µg (CLD), sendo testados contra os seguintes microrganismos: *Enterobacter aerogenes* (AMP, CFO, CFL, IPM, GEN, CPM,CRO); *Enterobacter cloacae* (AMP, CFL, CFO, AMI, CLO, GEN, IPM, CPM,CRO); *Escherichia coli* (AMP, CFL, ATM, IPM,CLO,CIP); *Proteus mirabilis* (AMP, CTX, TET, AMI, GEN, CAZ, IPM, ATM, CRO); *Proteus* spp. (AMP, NIT, AMI, GEN, IPM, ATM); *Pseudomonas aeruginosa* (CLO, SFT, AMP, CIP, CFL, AMI, GEN, CAZ, IPM); *Staphylococcus aureus* (ERI, SFT, CLO, OXA, RIF, TET, VAN); *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa (PEN, SFT, CIP, LVX, VAN, RIF, CLD); *Streptococcus* á-hemolítico (SFT, ERI, AMP, CLO, PEN, VAN); *Streptococcus pyogenes* (SFT, ERI, VAN, LVX, CRO, CLO).

Padronização do inóculo e semeadura

Os inóculos foram coletados com swab de algodão em infecções clínicas. Dez microrganismos foram isolados de diferentes focos infecciosos: *E. aerogenes* (ferida na região do osso ilíaco), *E. cloacae* [infecção de membros inferiores (MMII)], *E. coli* (infecção intrabdominal), *P. mirabilis* (infecção intrabdominal), *Proteus* spp. (infecção urinária), *P. aeruginosa* (infecção de MMII), *S.* (infecção de MMII), *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa (secreção de conjuntivite), *Streptococcus* α-hemolítico (ferida na região sacral) e *S. pyogenes* (infecção de orofaringe), sendo inoculados em nutriente ágar e mantidos por 24h à temperatura de 35° C. Após este período os microrganismos foram ressuspensos em solução fisiológica 0,9% (p/v) até obter-se uma turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de Mac Farland.

Aliquotas de 100 µL dessa suspensão foram semeadas por superfície em placas de Petri contendo cerca de 15 mL do meio Mueller-Hinton Ágar, com uma espessura de aproximadamente 4 mm (SHADOMY & SPNEL-INGROF, 1980).

Ensaio de antibiose

Para a avaliação da AA foi empregado o método da difusão em ágar (BAUER *et al.*, 1966). Após a semeadura dos microrganismos no meio, os discos com o mel e os discos com antibióticos comerciais foram distribuídos e levemente pressionados sobre o ágar. Foi mantida uma distância de 40 mm entre os discos para evitar interferência entre os halos de inibição. As placas foram incubadas à 35° C, e após 24h realizou-se a leitura dos resultados, que consistiu na medição do diâmetro dos halos de inibição, incluindo o próprio disco de 6 mm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão sumarizados os resultados obtidos nos ensaios de AA com o mel da abelha *Nannotrigona testaceicornis*, e os resultados obtidos nos testes com antibióticos comerciais frente a 10 diferentes microrganismos, indicando as resistências e sensibilidades obtidas.

Apesar de estudos de antibiose com produtos naturais comumente utilizarem cepas de microrganismos padrões, neste estudo em especial, foram utilizados microrganismos oriundos de focos infecciosos, visando caracterizar a real potencialidade deste material no controle de infecções clínicas. Os resultados indicam uma nítida atividade antimicrobiana do mel de *N. testaceicornis* frente a *E. coli*, *Proteus* spp., *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* spp. coag. - e *S. pyogenes*, todas patogênicas.

Este trabalho permitiu verificar alguns dados importantes, tais como a constatação da alta AA do mel obtido da *N. testaceicornis* contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *Proteus* spp. e *P. aeruginosa*), que nos testes de antibiose com antibióticos comerciais mostraram-se resistentes respectivamente à (AMP, CFL); (AMP, NIT) e (CLO, SFT, AMP, CIP, CFL); também, a constatação da sensibilidade dos Gram-positivos *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa e *S. pyogenes* que nos testes com antibióticos comerciais mostraram-se resistentes respectivamente à (PEN, SFT) e (SFT, ERI).

O método da difusão em ágar, baseado na técnica descrita por BAUER *et al.* (1966) é considerada de baixa

sensibilidade (JAMES *et al.*, 1972), pois a substância testada vai se diluindo conforme se difunde no ágar. No entanto, é considerado como o ensaio mais apropriado para agentes antibióticos tópicos, porque resgata a avaliação da difusibilidade (ALLEN *et al.*, 1991), importante para a avaliação do mel, uma vez que este é considerado um agente tópico ideal no tratamento de infecções cirúrgicas, queimaduras e feridas infecciosas (EFEM *et al.*, 1992).

Poucas pesquisas científicas foram direcionadas visando a caracterização das propriedades farmacológicas do mel produzido por meliponíneos. CORTOPASSI-LAURINO & GELLI (1991), comparando a AA dos méis de alguns meliponíneos em relação ao de *Apis mellifera*, constataram que do total de ensaios de antibiose realizados, 50% dos microrganismos mostraram-se sensíveis. Ao se comparar na literatura, a AA de diferentes amostras de mel de *A. mellifera*, frente aos microrganismos sensíveis ao mel de meliponíneos constata-se que estes apresentam uma atividade nitidamente superior aos méis de *A. mellifera*.

Várias substâncias tais como açúcares, ácidos orgânicos, diversos elementos químicos (WHITE, 1975), vitaminas e flavonóides (SABATIER *et al.*, 1992) foram identificadas no mel. Algumas enzimas secretadas por glândulas do aparelho digestivo das abelhas são introduzidas no néctar já a partir de sua coleta, como a glicose oxidase, que converte a glicose em glicolactona, produzindo também o peróxido de hidrogênio, este último considerado por muitos autores como sendo responsável pela AA constatada no mel (MENDES & COELHO, 1983).

Tabela 1 - Resultados da atividade antimicrobiana do mel da abelha *Nannotrigona testaceicornis*, frente a 10 diferentes microrganismos e os resultados dos testes de controle com antibióticos comerciais.

Microrganismo	Mel	Resistente	Sensível*
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Resistente	AMP, CFO, CFL.	IPM, GEN, CPM, CRO.
<i>Enterobacter cloacae</i>	Resistente	AMP, CFL, CFO.	AMI, CLO, GEN, IPM, CPM, CRO.
<i>Escherichia coli</i>	Sensível (19 mm)	AMP, CFL.	ATM, IPM, CLO, CIP.
<i>Proteus mirabilis</i>	Resistente	AMP, CTX, TET.	AMI, GEN, CAZ, IPM, ATM, CRO.
<i>Proteus</i> spp.	Sensível (10 mm)	AMP, NIT.	AMI, GEN, IPM, ATM.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sensível (11 mm)	CLO, SFT, AMP, CIP, CFL.	AMI, GEN, CAZ, IPM.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente	ERI, SFT.	CLO, OXA, RIF, TET, VAN.
<i>Staphylococcus</i> spp. coag.-	Sensível (15 mm)	PEN, SFT.	CIP, LVX, VAN, RIF, CLI.
<i>Streptococcus</i> α-hemolítico	Resistente	SFT, ERI.	AMP, CLO, PEN, VAN.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Sensível (14 mm)	SFT, ERI.	VAN, LVX, CRO, CLO.

AMI (amicacina), AMP (ampicilina), ATM (aztreonam), CAZ (ceftazidima), CIP (ciprofloxacina), CLI (clindamicina), CFO (cefotaxima), CFL (cefalotina), CTX (cefotaxima), CLO (cloranfenicol), IPM (imipenem), TET (tetraciclina), NIT (nitrofurantoina), SFT (sulfazotrim), ERI (eritromicina), PEN (penicilina G), GEN (gentamicina), CPM (cefepime), CRO (ceftriaxona), OXA (oxacilina), RIF (rifampicina), VAN (vancomicina), LVX (levofloxacina), Resistente= não houve desenvolvimento do halo de inibição; Sensível= medida do halo de inibição em mm, incluindo o próprio disco.

*Medidas padrões em mm dos halos de inibição de antibióticos comerciais AMI(17), AMP(18), ATM(20), CAZ(18), CIP(18), CLI(19), CLO(17), CPM(18), CRO(20), GEN(15), IPM(15), LVX(16), OXA(12), PEN(20), RIF(30), TET(18), VAN(17).

Estudos sobre antibiose em méis aquecidos constataram redução nos valores da AA e uma concomitante redução no conteúdo de peróxido de hidrogênio bem como da atividade catalítica da invertase (WHITE & SUBERS, 1964). Enzimas como diastase, catalase, α -glicosidase, peroxidase, lipase, amilase, fosfatase ácida e inulase, também foram detectadas na composição do mel (HUIDOBRO *et al.*, 1995), podendo estar relacionadas com sua AA.

Outros estudos, também constataram uma correlação direta entre a redução no conteúdo de peróxido de hidrogênio e a redução na AA de méis expostos a luz, concluindo-se que, quanto mais secreções as abelhas adicionam ao néctar ou a soluções açucaradas, mais ricas estas ficam em glicose oxidase e, conseqüentemente, a quantidade de peróxido de hidrogênio se torna maior, incrementando desta forma a AA destes méis (DUSTMANN, 1978). Entretanto outros autores (MOLAN & RUSSELL, 1988), após efetuarem a remoção enzimática do peróxido de hidrogênio contido no mel monofloral, constataram que o mesmo continuava inibindo o crescimento de *S. aureus*. Baseado nestes experimentos, estes mesmos autores sugeriram que substâncias antibacterianas adicionais, e não apenas o peróxido de hidrogênio, proveriam uma significativa parcela da AA do mel. Estes outros fatores estariam relacionados com as fontes florais do mel.

CORTOPASSI-LAURINO & GELLI, (1984) após observarem diferenças na AA de méis com diferentes origens florais, sugeriram que parte desta atividade estaria associada à secreções glandulares introduzidas pelas abelhas.

Estudos de ZUMLA & LULAT (1989), sugerem que o efeito osmótico, e o baixo pH encontrados no mel, contribuem para o rompimento da parede da célula bacteriana. Segundo MOLAN (1992), o efeito osmótico, o baixo pH e o acúmulo de determinados íons, constatados por WHITE (1975) e por PAMPLONA (1994) certamente contribuem para a AA do mel. A presença de flavonóides (SABATIER *et al.*, 1992), juntamente com o acúmulo de peróxido de hidrogênio estariam sinergisticamente atuando na AA final deste composto (WHITE & SUBERS, 1963).

Certamente os estudos efetuados até o presente momento não permitem concluir com clareza sobre a real participação de cada um dos fatores físico-químicos e bioquímicos sobre a AA do mel. Considerando os resultados obtidos até o momento, novos estudos estão sendo conduzidos com méis de outras espécies de abelhas-indígenas-sem-ferrão, sendo interessante também, utilizar diferentes concentrações do mel para verificar qual possui melhor AA.

CONCLUSÃO

O fato de se constatar *in vitro*, AA do mel da abelha *N. testaceicornis*, frente a diferentes microrganismos isolados de focos infecciosos, demonstra o excelente potencial terapêutico deste produto natural e vem fortalecer o papel da medicina popular como depositária de conhecimentos milenares que devem ser analisados cientificamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, K.L.; MOLAN, P.C.; REID, G.M. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.43, p.817-822, 1991.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, n.4, p.493-496, 1966.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLI, D.S. Propriedades antibacterianas de méis brasileiros. *Ciência e Cultura*, v.36, n.7, p.616, 1984.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLI, D.S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action des miels d'abellies africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. *Apidologie*, v.22, p.61-73, 1991.
- DUSTMANN, J.H. Sobre o efecto antibacteriano de la miel. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 1978, Portoroz, Yugoslavia. *Proceedings*. Portoroz: Apimondia, 1978, p.7-11.
- EFEM, S.E.E. Clinical observations on the wound healing properties of honey. *British Journal of Surgery*, v.75, p.679-681, 1988.
- EFEM, S.E.E.; UDOCH, K.T.; IWARA, C.I. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection*, v.20, n.4, p.227-229, 1992.
- EFEM, S.E.E. Recent advances in the management of Fournier's gangrene: Preliminary observations. *Surgery*, v.113, n.2, p.200-204, 1993.
- HUIDOBRO, J.F.; SANTANA, F.J.; SANCHES, M.P.; SANCHO, M.T.; MUNIATEGUI, S.; SIMAL-LOZANO, M. Diastase, invertase and b-glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. *Journal of Apicultural Research*, v.34, n.1, p.39-44, 1995.
- JAMES, O.B.O.L.; SEGROE, W.; VENTURA, A.K. Some antibacterial properties of Jamaican honey. *West Indian Medical Journal*, v.21, p.7-17, 1972.
- KERR, W.E. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. *Informe Agropecuário*, v.13, n.149, p.15-22, 1987.
- Krol, W.; Scheller, S.; Shani, J.; Pietsz, G.; Czuba, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel-Forschung*, v.43, n.5, p.607-609, 1993.
- KUMAR, A.; SHARMA, V.K.; SINGH, H.P.; PRAKASH, P.; SINGH, S.P. Efficacy of some indigenous drugs in tissue repair in buffaloes. *Indian Veterinary Journal*, v.70, p.42-44, 1993.

- MENDES, B.A. & COELHO, E.M. Considerações sobre características de mel de abelhas – Análises e critérios de inspeção. *Informe Agropecuário*, v.9, n.106, p.56-67, 1983.
- MOLAN, P.C. & RUSSELL, K.M. Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research*, v.27, n.1, p.62-67, 1988.
- MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, v.73, n.1, p.5-28, 1992.
- OSZMIANSKI, J & LEE, C.Y. Inhibition of polyphenol oxidase activity browning by honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.38, n.10, p.1892-1895, 1990.
- PAMPLONA, B. Comparación entre el miel de melipona y de *Apis mellifera*. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4.; FORO EXPOCOMERCIAL INTERNACIONAL DE APICULTURA, 1., 1994, Rio Quarto, Província de Cordoba. *Anales*. Rio Quarto: 1994. p.197-200
- POSEY, D.A. Etnoentomologia de tribos indígenas da amazônia. In: RIBEIRO, D. *Suma etnológica brasileira*. 1. Etnobiologia. 2.ed. Petrópolis: FINEP, 1987. v.1, p.251-271.
- SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey. *Journal of Food Science*, v.57, n.3, p.773-774, 1992.
- SHADOMY, S. & SPINEL-INGROF, A. Susceptibility testing: with antifungal drugs. In: LENNETTE, E. (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. 3.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1980. Cap.62, p. 647-653.
- WHITE, J.W. & SUBERS, M.H. Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay. *Journal of Apicultural Research* v.2, n.2, p.93-100, 1963.
- WHITE, J.W. & SUBERS, M.H. Studies on honey inhibine. 3. Effect of heat. *Journal of Apicultural Research*, v.3, n.1, p. 45-50, 1964.
- WHITE, J.W. Physical characteristics of honey. In: CRANE, E. (Ed.). *Honey a comprehensive survey*. London: Heinemann, 1975. Cap.6, p. 207-239.
- WILLIX, D.J.; MOLAN, P.C.; HARFOOT, C.G. A comparison of the sensivity of wound-infecting species of bacteria activity of manuka honey and other honey. *Journal of Applied Bacteriology*, v.73, p. 388-394, 1992.
- ZUMLA, A. & LULAT, A. Honey- a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v.82, p. 384-385, 1989.

Recebido em 3/11/05

Aceito em 19/12/05